

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 56-012546

(43)Date of publication of 06.02.1981
application :

(51)Int.Cl. G01N 27/46

G01N 27/40

// C12Q 1/00

G01N 33/18

(21)Application 54-072084 (71)Appli AJINOMOTO CO INC
number : cant :

(22)Date of 07.06.197 (72)Inven HIKIMA MOTOHIRO
filing : 9 tor : SUZUKI HIROSHI
YASUDA TAKEO
KARUBE MASAO
SUZUKI SHUICHI

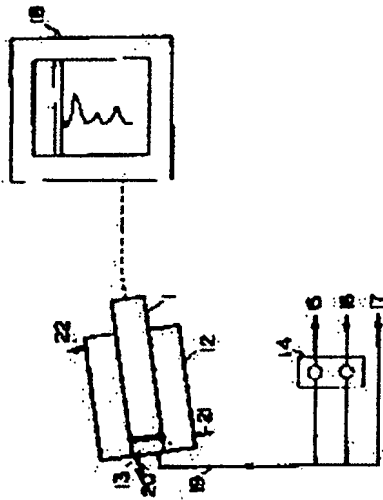
(54) METHOD AND APPARATUS FOR MEASURING BOD

(57) Abstract:

PURPOSE: To attain a stable measurement for a long time, by using an yeast of trichosporon family.

CONSTITUTION: A temperature preservation jacket 12 is maintained at a constant temperature by water of constant temperature which is supplied to and discharged from the jacket through a supply pipe 21 and a discharge pipe 22. A phosphorous buffer liquid saturated with oxygen is made to flow at a

constant velocity from an inlet 19 to an outlet 20 through a flow cell 13 until the output from a microbiological electrode 11 reaches an equilibrium electric current value. Then, the specimen liquid is supplied from a supply 15 into the flow cell 13 to contact the microbiological electrode 11. In consequence, the organic matters in the specimen liquid is diffused into the porous membrane and is utilized by the fixed yeast. The difference between the equilibrium current when the amount of oxygen has reached the equilibrium state and the equilibrium current before the supply of the specimen liquid is in proportion to the biochemical oxygen demand (BOD).



LEGAL STATUS

[Date of request for
examination]

[Date of sending the examiner's
decision of rejection]

[Kind of final disposal of
application other than the
examiner's decision of

rejection or application
converted registration]
[Date of final disposal for
application]
{Patent number}
[Date of registration]
[Number of appeal against
examiner's decision of
rejection]
[Date of requesting appeal
against examiner's decision of
rejection]
[Date of extinction of right]

⑪ 特許公報 (B 2)

昭61-7258

⑫ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公告 昭和61年(1986)3月5日
 G 01 N 27/46 A-7363-2G
 27/30 E-7363-2G
 // G 01 N 33/18 105 8506-2G 発明の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 BODの測定法

前置審査に係属中

⑮ 特 願 昭54-72084

⑯ 公 開 昭56-12546

⑰ 出 願 昭54(1979)6月7日

⑱ 昭56(1981)2月6日

⑲ 発 明 者 引 馬 基 彦 横浜市瀬谷区三ツ境158-26
 ⑲ 発 明 者 鈴 木 浩 川崎市幸区鹿島田958
 ⑲ 発 明 者 安 田 武 夫 横浜市港北区仲手原1-19-31
 ⑲ 発 明 者 野 部 征 夫 立川市富士見町4-11-18
 ⑲ 発 明 者 鈴 木 周 一 東京都豊島区巢鴨1-40-6
 ⑲ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号
 審 査 官 能 美 知 康

1

2

⑳ 特許請求の範囲

1 トリコスポロン (Trichosporon) 属に属する酵母類の菌体を固定化した微生物膜を溶存酸素電極の感応膜面に密着固定させた微生物電極を、被検液に接触させて、該被検液のBODに対応して起る上記微生物膜中の溶存酸素の減少を上記溶存酸素電極の出力電流の減少量、あるいは出力電流の減少速度として感知させて、被検液のBODを測定することを特徴とするBODの測定法。

㉑ 特許請求の範囲

1 本発明は生物化学的酸素要求量 (以下BODと記す) の測定法及びそれに用いられる装置に関し、詳しくはトリコスポロン (Trichosporon) 属に属する酵母類の菌体を固定化した微生物膜を溶存酸素電極の感応膜面に密着固定させた微生物電極を用いて上記微生物膜の有機物質化能によつて被検液中のBODに対応して起る該微生物膜中の溶存酸素の減少を上記微生物電極に感知せしめて電気化学的に被検液中のBODを測定するBODの測定法及び上記の微生物電極をその主要部とする該測定法に用いられる測定装置に関する。

現在、BODの測定は日本工業規格に定められている方法〔工場排水試験方法 JIS K0102 (1972)〕に従って行なわれているが、これらは長時間を要し、操作も煩雑であるために以前から簡略化が切望されてきた。本発明者等は、この目的

にかなうものとして微生物電極を用いて10~30分の短時間にBODを測定する方法を開発した。(昭和51年度日本醗酵工学大会講演要旨集P127、特開昭53-47895号、特願昭52-113625号 (特開昭54-47699号))

この方法は活性汚泥、土壤微生物をコーラゲン等で包括固定化して得られる固定化微生物膜、あるいは多孔質膜等で被覆した固定化微生物膜と溶存酸素電極とを組合せた微生物電極を、被検液に10~30分間接触させ、その際生起する溶存酸素電極の出力電流の減少量あるいは減少速度を測定するという極めて簡単な方法である。

この方法はBODを30分間以内の短時間で測定することが可能であり、BOD測定値の範囲が広く、測定値の再現性、精度が高く、しかも長時間くり返し使用でき、かつ自動化も容易であるなど従来法に比べて多くの利点を有する優れたBOD測定法である。

本発明者等はこの微生物電極の改良および実用化を目的としてさらに研究を行なつたところ、微生物電極を長時間連続的に使用すると微生物電極のBOD指示特性が次第に変化していくという問題点があつた。

微生物電極に使用する微生物は、活性汚泥あるいは土壤微生物を培養したものであり、細菌、糸状菌、酵母などの微生物群の菌体で構成されてい

る。これらの微生物群の菌体は微生物電極中に固定化されて測定に用いられている間も生きており、従って、その微生物の種類の構成比は、被検液の組成などによつてダイナミックに変動すべきものと考えられる。

BOD測定の場合の被検液中の汚泥物質は糖、有機酸をはじめとして多種類の化合物が含まれているが、これらの各成分に対する微生物電極の応答は固定化された微生物の資化性の有無によつて異なり、資化される場合は代謝過程での酸素消費量に左右されることが考えられる。

このように微生物の種類によつて資化性、酸素消費量が異なるので、固定化されている微生物の種類の構成比が変動すれば、その微生物電極のBOD指示特性が変化するものと推察される。

このために同一条件で製作した複数の微生物電極のBOD指示特性が、使用経歴などによつて変化して、同一の被検液に対して同一BOD指示値が得られなくなる。このことは測定方法として重大な問題点である。勿論、微生物電極はJISのBOD標準液（グルコース、L-グルタミン酸等量混合液）で校正しておくが、被検液は不特定多数の成分を含むので、この方法ではBODの指示特性の変動の十分な校正はできない。

本発明者らは、上述の欠点を改良するために活性汚泥などの複合菌に代えて単一菌を用いる方法に着目して鋭意検討を行つた結果、トリコスポロン属の酵母を用いることによつて上記の問題点を解決することができた。

BOD測定用微生物電極に用いる微生物は、被検液に含まれている多種類の成分を資化しうることが必要である。また、微生物電極に固定化して使用した状態で長期間安定した活性を示すことが要求される。

本発明者らは、酵母、細菌、放射菌など種々の微生物について試験した結果トリコスポロン属の酵母が広く種々の成分に対して資化性を示し、かつ活性が安定しており、本目的に適合することを見出した。本発明に用いるトリコスポロン属の酵母には、たとえば次のようなものがある。

- トリコスポロン・クタネウム
(*Trichosporon cutaneum*)
AJ 14076 CBS 2466
- トリコスポロン・フェルメンタンス
(*Trichosporon fermentans*)
AJ 5152 CBS 6382
- トリコスポロン・ブラシカエ
(*Trichosporon brassicae*)
AJ 4833 CBS 6382

これらの酵母は栄養培地で培養し、生育力の強い対数増殖期に集菌、洗浄後生理食塩水中に懸濁して低温下に保存するか、多孔質膜に塗布あるいは濾過する方法で付着させたのち、自然乾燥させ、室温で長期間保存することができる。

第1図は本発明の微生物電極11の一例を示すものである。第1図1はアルミニウムアノード、2は塩化カリウム電解液、3は白金カソード、4は外筒、5はポリフッ化エチレン系樹脂膜、6はOリング、8は酵母菌体、9は多孔質膜、10は穴あきキャップをそれぞれ示す。第1図の1～6は溶存酸素電極を構成しており、一般に市販されているものと同様なものである。また9の多孔質膜は封入した酵母は通過させないが、被検液中の溶解成分、酸素などは自由に通過させるものであればよく、たとえば、アセチルセルロース膜、セロファン膜などを用いる。8の酵母菌体を封入、固定化する方法として、多孔質膜9に集菌後直接塗布するか、培養液を濾過する方法によつて微生物菌体を均一に付着させた後、微生物付着面を溶存酸素電極の感応膜5のポリフッ化エチレン系樹脂膜に密着させ10の穴あきキャップに固定する。

なお、固定化微生物膜は昭和54年5月19日出願の明細書に示す2枚の多孔質膜の間に酵母を封入したものをを用いてもよい。封入する酵母菌体の量は、多孔質膜を通して拡散してくる被検液中の有機物をすみやかに資化するのに十分な量を封入することが望ましい。すなわち、有機物の拡散がその資化過程での律速となるように十分な量の酵母を封入することが望ましい。

第2図は本発明による微生物電極を用いたBOD測定システムの1例を示す。第2図中11は微生物電極、12は保温ジャケット、21、2

5

2はそれぞれ定温水の送入、排出管、13は測定用フローセル、19、20それぞれの送入口、排出口、14は定流量ポンプ並びに15は被検液、16はバツファ液、17は空気のそれぞれ送入口及び18は記録計をそれぞれ示す。

以下に本発明のBOD測定原理を説明する。測定にあつては21、22より定温水を送入排出して保温ジャケット12を恒温に保ち、16と17より酸素飽和したりん酸バツファ液(0.01M、pH7)を入口19よりフローセル13内に一定速度で流通させて出口20より排出させ微生物電極11の出力を平衡電流値(ベースライン)に到達させる。この状態は、固定化微生物膜に拡散してくる溶存酸素量と固定化した酵母菌体の内性呼吸により消費される溶存酸素量が平衡しており、そのときの固定化微生物膜内の溶存酸素濃度に対応する溶存酸素電極の出力電流が得られていることを示す。つぎに15より一定時間被検液をフローセル内に注入して微生物電極に接触させると、被検液中の有機物は多孔質膜内へと拡散いき、固定化した酵母菌体によつて資化される。それによつて酵母の呼吸が盛んとなり、固定化微生物膜内の溶存酸素は減少しそれに伴つて微生物電極の出力電流は減少していき、10-20分後に一定値に達する。この状態は、酵母によつて消費される酸素量と固定化微生物膜内へ拡散してくる酸素量が平衡に達していることを示し、この平衡電流値と被検液を注入する前の平衡電流値(ベースライン)との差は、被検液のBODに比例する。微生物電極によるBOD測定は温度20-30℃、pH5-8の間の任意の一定条件で行なわれ、被検液の希釈液はりん酸バツファ液(0.05-0.001M、pH7)を使用することが望ましい。16よりのバツファ液は測定時の被検液のpHを一定に保ち測定精度を向上させるとともに、りん酸イオンは呼吸活性を活発化させる作用があるので、微生物電極の応答速度をあげる働きがある。微生物電極11は被検液中のりん酸イオンに影響されやすいが、りん酸系のバツファ液を用いることにより十分な量のりん酸イオンを添加することにより、被検液中のりん酸イオンの影響を除去することができる。(特願昭52-113625号で記述済)

フローセル13内には16よりのバツファ液、被検液とともに17より空気(50-500ml/min)

6

又は酸素を供給し、セル内液を酸素を飽和させると同時に、液を流動させ固定化微生物膜内への酸素、有機物等の拡散(物質移動係数)を一定に維持する。本発明による固定化酵母菌体は、先に述べたように多孔質膜に付着、乾燥させたのち、数ヶ月間室温で保存しておき、必要に応じて微生物電極に組立て、使用することができる。

本発明によるBOD測定法は、被検液中のBOD値を20分以内という極めて短時間に測定でき2週間以上連続的に使用でき、しかも塩類の影響も極めて小さく、再現性及び精度も優れている。従来の活性汚泥、土壌微生物を用いるBOD測定法では、常に一定した微生物種類構成比の種菌の入手が困難であるが本発明では、単一酵母を使用するために常に一定した菌株が入手でき、従つて、常に特性の一定した微生物電極を製作することができる。

従つて、本発明によつてより信頼性の高いBOD測定が行ないうるという利点がある。以下本発明の実施例を示す。実施例中%は特記なき限りg/dℓ%を示す。

実施例 1

BOD測定用微生物電極に適当な微生物を検索するため、酵母、細菌、放線菌を固定化した微生物電極を製作し、各種の糖、有機酸に対する応答を調べた。

酵母はマルトエキス0.3%、酵母エキス0.3%、ポリペプトン0.3%、寒天2%を含むスラント培地(pH6.0-6.2)に、また細菌、放線菌は肉エキス1%、ポリペプトン1%、食塩0.5%、寒天2%を含むスラント培地(pH7.0-7.2)にそれぞれ接種して、30℃で2日間培養した。そののち生育した菌をかきとり5mlの殺菌水に懸濁させたのち、直径47mmφのアセチルセルロース膜9で濾過して、微生物をアセチルセルロース膜9の表面に付着せしめた。このように製作した微生物膜を適当な大きさに切りぬき第1図に示すように溶存酸素電極のテフロン膜5上上に微生物の付着した面を装着して微生物電極11を組立てた。

このようにして製作した微生物電極11を第2図に示すような測定装置に取付け、ジャケット12に21より温水を流して22より排出させ30℃に保ち、りん酸バツファ液16(0.05M、pH7)を3.9ml/minで、17より空気を250ml/minそ

れぞれ送り酸素飽和させたりん酸バッファ液を常時フローセルに供給した。このようにして記録計 18 に示される微生物電極出力電流が一定の平衡電流値になったのちに被検液として糖、有機酸の溶液（濃度 2g/l）を 30 分間に 1 度、それぞれ 5 分間づつ、流量 0.1 ml/min の速度で注入し*

*て、微生物電極の出力電流を調べた。その結果表 1 に示すようにトリコスポロン・クタネウムは他の微生物に比べて、より多くの種類の有機物質（糖、有機酸）に対して応答する。このことは不特定多数の成分を含む実際の廃水の BOD 測定に適用であることを示す。

表 1

基質有機物	酵 母 類			細菌類	放線菌
	トリコスポロン・クタネウム	ハンゼスラ・アノマラ	ピヒア・ファリノーザ	シユードモナス・エアロギノーザ	ストレプトミセス・フラベウス
	<i>Trichosporon cutaneum</i>	<i>Hansenula anomala</i>	<i>Pichia farinosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptomyces flaveus</i>
	CBS 2466	CBS 5759	IFO 0465	ATCC 10145	ATCC 3319
D-グルコース	100	100	100	100	100
D-ガラクトース	14	36	35	8	7
蔗 糖	31	45	0	8	78
D-マルトース	80	14	0	0	0
乳 糖	5	0	0	0	14
L-ソルボース	12	8	4	0	21
セロビオース	25	4	20	0	0
トレハロース	75	0	46	0	7
ラフィノース	5	2	0	0	0
可溶性澱粉	5	0	0	0	0
D-キシロース	18	10	0	0	21
L-アラビノース	14	0	0	0	7
D-アラビノース	21	0	0	0	10
サ リ シ ン	27	30	46	0	0
D L - 乳 酸	6	14	2	65	83
こ は く 酸	8	6	0	20	13
く え ん 酸	2	5	8	0	7

実施例 2

(Trichosporon cutaneum AJ 14076 CBS2466)

トリコスポロン属の酵母を用いた BOD 測定用 40 を接種し、30°C で 48 時間振とう培養した。この培養液 3 ml を直径 47 mmφ のアセチルセルロース膜で濾過して、菌体をアセチルセルロース膜の表面に付着させたのちに自然乾燥させて室温で保存した。このようにして製作した微生物膜を実施例 1

と同様に、第1図に示すような微生物電極に組立て、これを第2図のような測定装置に取付けた。ジャケット12内に30°Cの温水を流して微生物電極11を一定温度に保ちつゝ、酸素飽和させたりん酸バッファ液(0.05M、pH7)を1.0ml/minで、空気を250ml/minで、それぞれ常時16、17より送入口19を経てフローセル13に送り込んだ。微生物電極の出力電流が一定になった後、日本工業規格に定められているグルコース-レグルトミン酸の等量混合液によるBOD標準液(工場排水試験方法JIS K0102(1972) P.33)のBOD120、240、360ppmのものを0.2ml/minの速度で15より14を通じて25分間づゝ注入し、微生物電極の出力電流の時間的変化を記録させた。その結果第3図〔(横軸時間(分)、縦軸電流(μA))〕に示すように、BOD標準液を注入すると微生物電極の出力電流はすみやかに減少を始め、15分後にほぼ一定となりそれぞれa(120ppm)、b(240ppm)及びc(360ppm)の平衡電流が得られた。標準液注入前との電流差と標準液のBODの関係をプロットすると第4図〔(横軸BOD(ppm)、縦軸電流差(μA))〕に示すように直線関係が得られた。

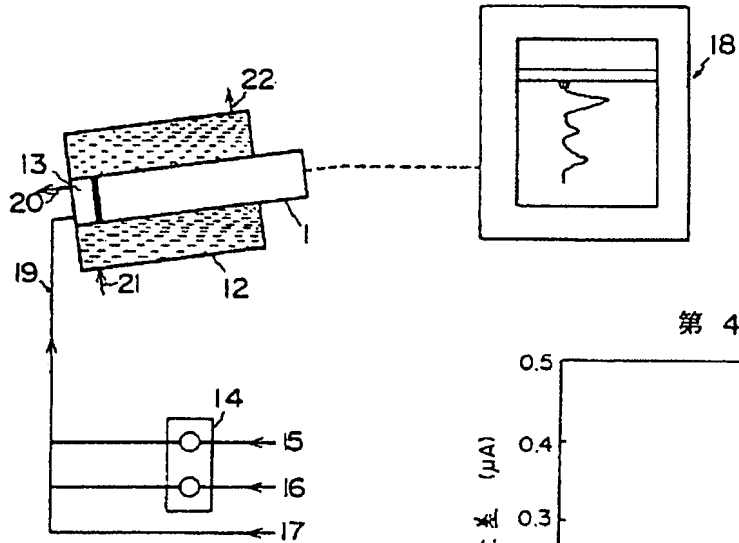
つぎに発酵工場の未処理廃水のBODを本法によつて測定し、別に行つたJIS法の結果と比較した。その際、本法で測定する場合、廃水はその濃度に応じて1~10倍イオン交換水で希しく後測定し、測定結果は希しく倍数を乗じて原水BODを計算してプロットした。その結果を第5図〔(横軸JIS法(ppm)、縦軸本発明方法(ppm))〕に示す。本法の測定結果はJIS法に比べて1.2倍(回帰係数)とやや大きめの値を示しているが、良い対応関係が得られており、5日間を要するJIS法BODの結果が簡便に30分以内に推定

できることが分つた。次に微生物電極を連続的に作動させ、その耐久性を調べた。第6図〔(横軸時間(日)、縦軸電流(μA))〕はサンプルを注入しないときの微生物電極の出力電流値(ベースライン)(白丸)とJIS標準液120ppmを注入したときの平衡電流値(黒丸)を作動経過時間に対してプロットしたものである。第6図から微生物電極は17日以上 of 長期間に亘つて安定した指示を示すことが判る。120ppmの標準液に対する電流差は17日間を通じて±20%以内であつた。なおこの電流差のバラツキはポンプ中の注入量の変動、微生物電極感応面の汚れなどに起因すると考えられる。実際のサンプルを測定するときは標準液で随意校正することによりその影響を除くことができる。

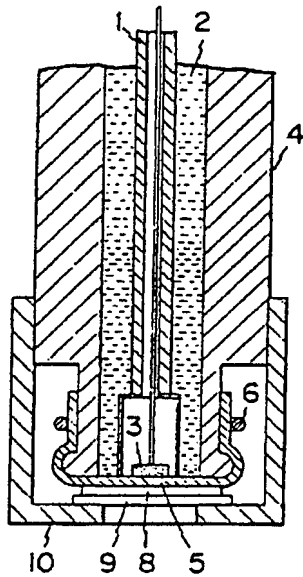
図面の簡単な説明

第1図は本発明の方法に使用する微生物電極の構造を示す正面縦断説明図、第2図は第1図の微生物電極を用いたBOD測定システムの一例を示す系統説明図、第3図は本発明の実施例2の本発明の装置と方法を用いて種々のBODの標準液を被検液としてBODを測定したときの出力電流の時間的経過を示すグラフ、aは120ppm、bは240ppm、c360ppmの出力電流変化を示す。第4図は第3図の標準供試液のBOD(ppm)とその平衡電流値の標準液注入前との電流差の関係を示すグラフ。第5図は実際に発酵工場の未処理廃水のBODをJISの測定法(5日間法)(横軸)で測定した場合と本発明の方法(縦軸)で測定した場合の測定値の相関を示すグラフ。第6図は本発明の方法の経時的安定性を示すグラフ、白丸は試料を注入しないときの電流ベースライン、黒丸は120ppmの標準液を注入したときの平衡電流値のそれぞれ経時的変化を示すグラフ。

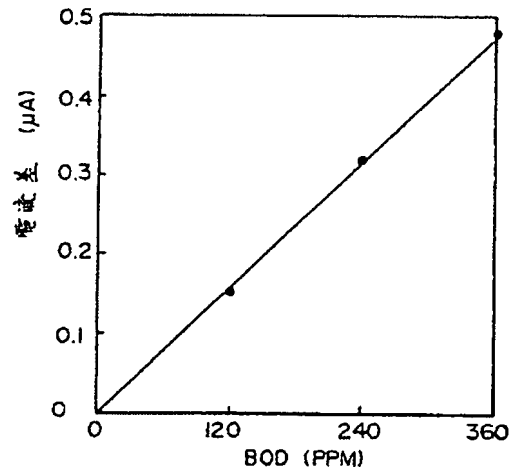
第 2 図



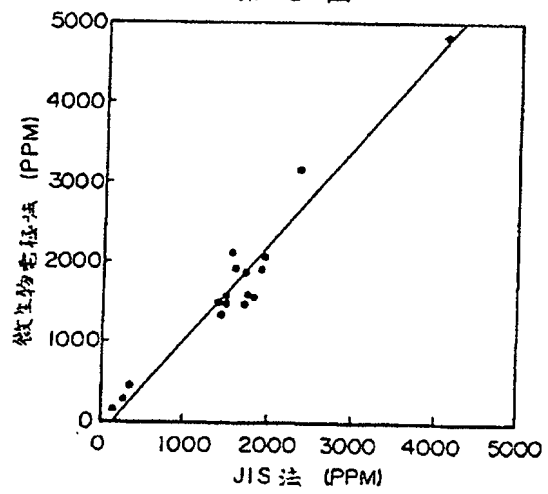
第 1 図



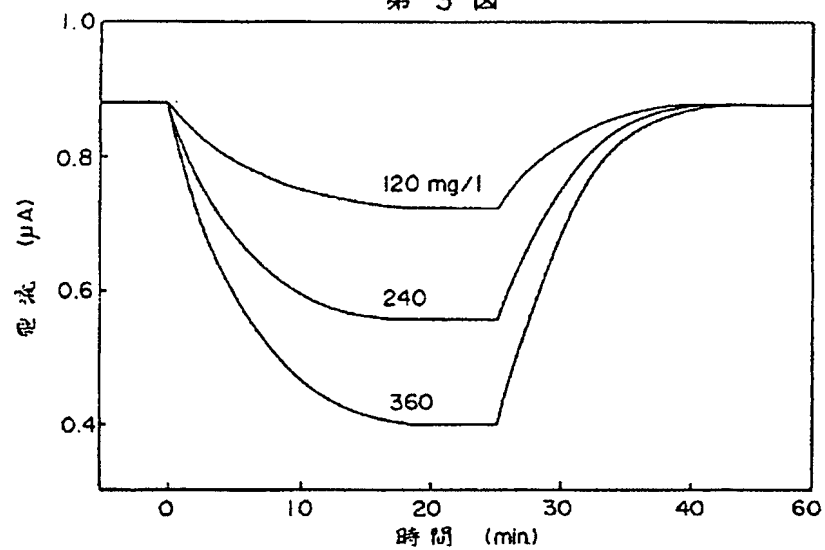
第 4 図



第 5 図



第 3 図



第 6 図

